

①⑨ RÉPUBLIQUE-FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication : 2 798 672

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : 99 11663

⑤① Int Cl⁷ : C 12 N 9/08, C 07 K 16/40, G 01 N 33/53, 33/68,
A 61 P 25/00, 35/00, 37/00

①⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 17.09.99.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.03.01 Bulletin 01/12.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-
que et industriel — FR.

⑦② Inventeur(s) : RABILLOUD THIERRY.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ FORMES ACIDES DES PEROXYREDOXINES ET LEUR UTILISATION COMME MOYEN DE DIAGNOSTIC.

⑤⑦ Formes acides purifiées des peroxyrédoxines et les
fragments de celles-ci, caractérisés en ce qu'ils compren-
nent, dans une région proche de leurs site actif, la séquence
SEQ ID N° 2 suivante:

Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X4 X3 Thr Glu
dans laquelle X1 représente n'importe quel acide aminé
naturel, X2 représente un acide aminé choisi dans le groupe
constitué par la phénylalanine et la proline, X3 représente
un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la proli-
ne et la thréonine et X4 représente un acide cystéine sulfi-
nique ou un acide cystéique (acide cystéine sulfonique).
Utilisation comme moyen de diagnostic et en thérapeutique.

FR 2 798 672 - A1



BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

La présente invention a pour objet les formes acides des peroxyrédoxines et leur utilisation comme moyen de diagnostic.

Le phénomène de mort cellulaire programmée (apoptose), joue un rôle important dans la vie des organismes multicellulaires.

5 Ce phénomène de mort cellulaire intervient au cours du développement embryonnaire normal, par exemple pour éliminer les neurones surnuméraires, ou dans l'élimination des cellules immunitaires autoréactives.

En revanche, une mort cellulaire anormale, non programmée, existe dans de nombreuses pathologies, notamment dans les pathologies neurodégénératives, inflammatoires et cardiaques. Cette mort cellulaire peut être accélérée, par exemple en cas d'ischémie ou d'athérosclérose, ou au contraire, les cellules peuvent échapper à cette mort cellulaire, par exemple dans le cas de maladies auto immunes ; cette absence de mort cellulaire explique également le caractère malin de certaines pathologies comme les cancers.

15 Ainsi ce phénomène oxydant est impliqué dans la mort cellulaire induite par des composés chimiques ou biologiques (Degli Espoti M. *et al.* (1998), *FEBS Lett.* **430**, 338-342 ; Quillet-Mary A. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, **272**, 21388-21395), dans le syndrome d'ischémie-reperfusion (Parkins C. S. *et al.* (1998), *Free Radic. Res.*, **28**, 271-281) ou dans la génération des plaques d'athérome en cas d'athérosclérose (Aviram M. *et al.* (1998), *Mol. Cell. Biochem.*, **188**, 149-159).

20 Une des étapes importantes de la mort cellulaire ou apoptose est le phénomène de stress oxydant qui peut être défini comme l'action des espèces réactives oxygénées (superoxydes, peroxydes, hydroperoxydes et radicaux hydroxyles) ou des espèces réactives nitro-oxygénées (oxydes d'azote et peroxynitrites) sur les molécules biologiques telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

25 Outre l'apparition des espèces réactives mentionnées précédemment, le phénomène de stress oxydant dépend d'un autre facteur, à savoir la destruction de ces espèces chimiques réactives par des systèmes de protection cellulaire. Ces systèmes font intervenir soit des molécules réductrices comme la vitamine A et la vitamine E, soit des systèmes enzymatiques comme les superoxydes dismutases, les catalases et les peroxydases.

Parmi les peroxydases, se trouvent les peroxydases dépendantes du glutathion et les peroxydases dépendantes de la thiorédoxine.

35 Les peroxydases dépendantes de la thiorédoxine (TPx), également appelées peroxyrédoxines, ont été initialement découvertes dans les levures (Kim K. *et al.* (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 4704-4711) puis chez le rat (Kim I. *et al.* (1989), *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6018-6122) et se sont révélées hautement conservées à travers les espèces, y compris chez l'homme. Ce sont des antioxydants qui protègent les molécules biologiques contre l'oxydation et qui fonctionnent comme peroxydases, uniquement lorsqu'elles sont couplées à la thiorédoxine ou à un intermédiaire
5 contenant un thiol (Pahl, P. *et al.* (1995), *Genomics*, 26, 602-606).

Les peroxyrédoxines sont caractérisées par la présence, dans la région bordant leur site actif, de la séquence SEQ ID N° 1 suivante :

Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val Cys X3 Thr Glu

dans laquelle X1 représente n'importe quel acide aminé naturel, X2 représente la
10 phénylalanine ou la proline et X3 représente une proline ou une thréonine.

Leur rôle dans la cellule est à l'heure actuelle très mal connu mais plusieurs hypothèses ont été émises. Ainsi la demande internationale WO 98/43666 qui décrit une nouvelle protéine appartenant à la famille des peroxyrédoxines, appelée AOP2, suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la protection contre
15 l'athérosclérose.

Récemment certains auteurs ont montré (Zhang P. *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 30615-30618) que la thiorédoxine peroxydase de mammifère (TPx II) est un puissant inhibiteur de l'apoptose due à l'apparition d'espèces oxygénées réactives dans des cellules leucémiques Molt-4 traitées par des agents chimiques
20 comme les céramides ou l'étoposide.

D'autres auteurs (Kang S.W. *et al.* (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 6297-6302) ont montré que les différentes isoformes cytosoliques des peroxyrédoxines de mammifères (Prx I, Prx II) diminuent la quantité de peroxyde d'hydrogène induit par les facteurs de croissance ou le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), suggérant que ces enzymes joueraient un rôle non seulement dans
25 l'élimination du peroxyde d'hydrogène, mais participeraient également au signal des facteurs de croissance et du TNF- α .

Or les Inventeurs ont montré de manière surprenante que lorsqu'un stress oxydant est induit, *in vitro*, par un agent chimique dans des cellules en culture, il
30 apparaît des formes acides des peroxyrédoxines, qui sont caractéristiques de la présence de ce stress.

Ces formes acides, caractérisées par un point isoélectrique plus acide que celui des formes normales des peroxyrédoxines correspondantes, résultent d'une modification directe des peroxyrédoxines et non pas d'une altération du gène codant
35 pour lesdites peroxyrédoxines.

De plus les Inventeurs ont montré que, dans le cas d'un stress intense mais de courte durée, la quantité totale de peroxyrédoxines ne varie pas alors que le rapport entre la forme acide et la forme native est augmenté par ledit stress.

5 Aussi les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir aux formes acides purifiées des peroxyrédoxines, à l'utilisation de ces formes acides ou du rapport entre les formes natives et les formes acides des peroxyrédoxines comme moyen de diagnostic.

Ce moyen de diagnostic est simple à mettre en œuvre, rapide, et permet de mettre en évidence de manière fiable, la présence d'un désordre
10 métabolique lié à un stress oxydant, même si ce stress est de courte durée.

La présente invention a en conséquence pour objet les formes acides purifiées des peroxyrédoxines et des fragments de celles-ci, caractérisés en ce qu'ils comprennent, dans une région proche de leur site actif, la séquence SEQ ID N° 2 suivante :

15 Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X4 X3 Thr Glu

dans laquelle

X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,

X2 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la phénylalanine et la proline,

20 X3 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la proline et la thréonine et

X4 représente un acide cystéine sulfinique ou un acide cystéique (acide cystéine sulfonique),

ainsi que leurs équivalents fonctionnels.

25 Au sens de la présente invention, on entend par formes acides purifiées des peroxyrédoxines et des fragments de celles-ci, aussi bien les formes naturelles, que les fragments synthétiques obtenus par les techniques classiques de synthèse peptidique, et notamment par la technique de synthèse en phase solide décrite par Merrifield R. B. (1963), *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154 ou par des techniques
30 d'ADN recombinant (Corti, A., et al. (1997) *Eur. J. Biochem.* **248**, 692-699) ou par combinaison de ces deux types de techniques.

Au sens de la présente invention, on entend par équivalents fonctionnels, des séquences d'acides aminés comprenant des délétions, ou des additions, des modifications ou des substitutions conservatives ou une combinaison de celles-ci,
35 au niveau de un ou plusieurs acides aminés, de manière à ce que la structure tertiaire et l'activité antioxydante ne soient pas altérées.

Les modifications comprennent notamment celles résultant des processus posttraductionnels ou des modifications chimiques réalisées par des techniques classiques connues de l'homme du métier (acylation, fixation de lipides, de nucléotides, cyclisation ...).

5 Les modifications comprennent également celles résultant d'un couplage des peptides, par des liaisons covalentes, ioniques ou faibles à une molécule susceptible d'augmenter leur affinité pour un type de cellule particulier, notamment des couplages avec des peptides vecteurs.

10 Les substitutions conservatives bien connues de l'homme du métier, comprennent notamment la substitution d'un aminoacide par un autre aminoacide ayant même charge (aminoacides acides : Asp et Glu ; aminoacides basiques : Lys, Arg et ornithine ; aminoacides polaires neutres : Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, His et Trp), même taille, même caractère hydrophile (aminoacides hydrophobes : Ala, Val, Leu Ile, Pro, Phe et Met), même aromaticité (Phe et Tyr) et/ou même capacité à former
15 des hélices.

Il est bien entendu que les équivalents fonctionnels comprennent également comme aminoacides, ceux qui sont des énantiomères et des diastéréoisomères des aminoacides naturels de conformation D, les aminoacides rares, notamment l'hydroxyproline, la méthyllysine et la diméthyllysine et les aminoacides
20 synthétiques, notamment l'ornithine, la norleucine, la cyclohexylalanine et les oméga-aminoacides. Les équivalents fonctionnels recouvrent également les rétropeptides.

Dans un mode de réalisation particulier de réalisation de l'invention, ces peroxyrédoxines sont choisies dans le groupe constitué par les peroxyrédoxines de mammifères humains ou non.

25 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, les formes acides sont celles de TDX 1 d'origine humaine (SEQ ID N° 3), TDX M d'origine humaine (SEQ ID N° 4), TDX N d'origine humaine (SEQ ID N° 5), AOP 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 6) et TDX 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 7), ainsi que leur fragments comprenant la SEQ ID N° 2.

30 La présente invention a également pour objet des anticorps immunospécifiques dirigés contre les formes acides des peroxyrédoxines.

Dans un mode particulier de réalisation desdits anticorps, ils sont choisis dans le groupe constitué par des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux.

35 Dans un autre mode particulier de réalisation desdits anticorps, ils sont dirigés contre les formes acides des peroxyrédoxines choisies dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal approprié (notamment un mammifère ou un gallinacé) avec la forme acide d'une peroxyrédoxine selon l'invention, éventuellement couplée à une protéine convenablement choisie telle que la sérum albumine bovine (SAB) ou la KLH (*Kyu limpet hemocyanin*), notamment selon les techniques décrites par Goumon Y. *et. al.* (1998), *J. Biol. Chem.*, 273, 29847-29856 et par El-Majdoubi M., (1996), *J. Neuro. Cytol.*, 25, 405-416.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus de manière connue en soi, notamment par fusion des cellules spléniques de souris immunisées avec un antigène consistant en la forme acide d'une peroxyrédoxine telle que définie ci-dessus, éventuellement couplée à une protéine convenable telle que SAB ou KLH avec des cellules myélomateuses appropriées.

La présente invention a également pour objet un réactif pour la détection et/ou le dosage des formes acides des peroxyrédoxines selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps spécifique des formes acides des peroxyrédoxines.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection des formes acides des peroxyrédoxines selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec un réactif conforme à l'invention et une étape dans laquelle on détecte une interaction spécifique entre ledit réactif et les formes acides des peroxyrédoxines telles que définies ci-dessus et présentes dans l'échantillon.

La présente invention a également pour objet un procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines selon l'invention, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on sépare les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique, puis suivant leur poids moléculaire et une étape dans laquelle on détecte et/ou on dose lesdites formes acides.

Au sens de la présente invention un échantillon biologique est choisi dans le groupe comprenant notamment le cœur, les artères, la peau, les muscles, le cerveau, les poumons, la rate, le sang, les cellules sanguines, la moelle, le colon, l'intestin l'œsophage, l'estomac, et l'urine.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, il comprend en plus le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la détermination du rapport entre la forme acide et entre la forme native de chaque peroxyrédoxine.

Dans un autre mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, la détection et/ou le dosage des formes acides et des formes natives des peroxyrédoxines peuvent être réalisés par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par la technique colorimétrique décrite par T. Rabilloud *et al.* (*Electrophoresis*.(1998), 19, 1006-1014).

Dans un autre mode de mise en oeuvre particulier de ce procédé, la séparation des formes acides et des formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique peut être réalisée par tout moyen connu de l'homme du métier, notamment par les techniques de focalisation isoélectrique telle que celle décrite par T. Rabilloud *et al.* (*Electrophoresis*.(1997), 18, 307-316).

Dans un autre mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines, après séparation, peuvent être réalisés avec un anticorps capable de se lier à la fois aux formes natives et aux formes acides des peroxyrédoxines; notamment avec un anticorps tel que ceux décrits dans la demande internationale WO 98/43666.

Dans un autre mode particulier de mise en oeuvre de ce procédé, la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines sont réalisés avec des anticorps spécifiques de chaque forme.

Pour la mise en oeuvre des différents procédés de détection et/ou de dosage selon l'invention, les anticorps peuvent être fixés sur un support solide et les peroxyrédoxines détectées et/ou dosées par compétition ou par une méthode sandwich. Dans ce cas, pour détecter la liaison antigène/anticorps, on utilise des marqueurs appropriés ou d'autres anticorps eux-mêmes conjugués à des marqueurs convenables, lesdits autres anticorps étant des anticorps classiquement utilisés, tels que par exemple, une IgG dirigée contre le deuxième anticorps et produite notamment chez la chèvre, le porc ou l'âne.

Parmi les marqueurs utilisés, on peut citer à titre d'exemple les marqueurs fluorescents, le système biotine/streptavidine, les marqueurs non isotopiques ou des enzymes, comme par exemple la peroxydase de raifort ou la phosphatase alcaline.

La présente invention a également pour objet un procédé de dépistage d'un trouble métabolique lié au stress oxydant, caractérisé en ce que l'on détermine, *in vitro*, dans un échantillon biologique, le rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

La présente invention a également pour objet un coffret ou trousse de diagnostic pour mettre en oeuvre ledit procédé de dépistage, caractérisé en ce qu'il

comprend au moins un anticorps spécifique des formes acides des peroxyrédoxines et au moins un anticorps choisi dans le groupe constitué par les anticorps capables de se lier à la fois aux formes natives et aux formes acides des peroxyrédoxines et les anticorps spécifiques des formes natives des peroxyrédoxines, des moyens de
5 détection appropriés et au moins un témoin constitué par un échantillon de référence.

La présente invention a également pour objet une méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent
10 provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible de stimuler ladite formation,
- le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

15 La présente invention a également pour objet une méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent
20 provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible d'inhiber ladite formation,
- le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

Pour la mise en oeuvre de ces méthodes de sélection, les
25 peroxyrédoxines, sous formes natives, peuvent être en solution ou fixées sur des supports ou exprimées dans des cellules convenablement choisies.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une molécule apte à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la préparation d'un médicament favorisant la mort cellulaire.

30 Dans un mode particulier de mise en oeuvre de cette utilisation, le médicament est un anticancéreux ou est utilisable dans le traitement des maladies auto immunes.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une molécule apte à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la
35 préparation d'un médicament inhibant la mort cellulaire.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre de cette utilisation, le médicament est utile dans le traitement des troubles neurodégénératifs.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

- 5 - la figure 1 représente l'effet d'un stress oxydant induit par du *tert*-butyl-hydroperoxyde dans des fibroblastes embryonnaires humains non transformés (souche GM10 déposée auprès du NIGMS *Coriell Cell Repositories*, Camden, New Jersey) - 1A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; 1B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; 2A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine d'origine humaine, TDX N ; 2B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine d'origine humaine, TDX N ; 3A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 3 d'origine humaine, (TDX M) ; 3B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine 3 d'origine humaine (TDX M) ; 4A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine d'origine humaine, AOP 2 ; 4B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine, AOP 2 - (1a) " extrait cellulaire contrôle " correspond à des cellules non traitées et (1b) " extrait cellulaire BHP " correspond à des cellules traitées par du *tert*-butyl-hydroperoxyde selon la méthode décrite dans l'exemple 1,
- 10 - la figure 2 représente la quantité relative des formes acides et natives des peroxyrédoxines exprimée en pourcentage des protéines totales, et la détermination du rapport forme acide sur forme native pour différentes peroxyrédoxines dans des fibroblastes embryonnaires humains non transformés (souche GM10) témoins ou traités par du *tert*-butyl-hydroperoxyde (stress oxydant) selon la méthode décrite dans l'exemple 1,
- 15 - la figure 3 représente l'effet d'un stress oxydant induit par du *tert*-butyl-hydroperoxyde dans des hématies - 1A correspond à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; 1B correspond à la forme native de la peroxyrédoxine 1 d'origine humaine (TDX 1) ; (3a) " extrait cellulaire contrôle " correspond à des hématies non traitées et (3b) " extrait cellulaire BHP " correspond à des hématies traitées par du *tert*-butyl-hydroperoxyde selon la méthode décrite dans l'exemple 1,
- 20 - la figure 4 illustre la détection par un anticorps de la forme acide de TDX 1 (1A) et de la forme native de TDX 1 (1B) dans des lymphocytes T humains, cellules Jurkat (souche déposée à l'*American Type Culture Collection* sous le n° ATCC : TIB 152), après séparation des deux formes par électrophorèse bidimensionnelle réalisée selon la méthode décrite dans l'exemple 1,
- 25 - la figure 5 illustre la détection par un anticorps de la forme acide de TDX 1 (1A) et de la forme native de TDX 1 (1B) dans des lymphocytes T humains, cellules Jurkat (souche déposée à l'*American Type Culture Collection* sous le n° ATCC : TIB 152), après séparation des deux formes par électrophorèse bidimensionnelle réalisée selon la méthode décrite dans l'exemple 1,
- 30 - la figure 6 illustre la détection par un anticorps de la forme acide de TDX 1 (1A) et de la forme native de TDX 1 (1B) dans des lymphocytes T humains, cellules Jurkat (souche déposée à l'*American Type Culture Collection* sous le n° ATCC : TIB 152), après séparation des deux formes par électrophorèse bidimensionnelle réalisée selon la méthode décrite dans l'exemple 1,
- 35 - la figure 7 illustre la détection par un anticorps de la forme acide de TDX 1 (1A) et de la forme native de TDX 1 (1B) dans des lymphocytes T humains, cellules Jurkat (souche déposée à l'*American Type Culture Collection* sous le n° ATCC : TIB 152), après séparation des deux formes par électrophorèse bidimensionnelle réalisée selon la méthode décrite dans l'exemple 1,

- la figure 5 représente la quantité relative des formes acides et natives des peroxyrédoxines exprimées en pourcentage des protéines totales et la détermination du rapport forme acide sur forme native pour différentes peroxyrédoxines dans des cellules Jurkat traitées par de l'antimycine A en présence ou non de phénylbutylnitron comme antioxydant. La colonne " anti A " correspond aux cellules traitées par l'antimycine A seulement. La colonne " anti A + PNB " correspond aux cellules traitées par l'antimycine A et la phénylbutylnitron selon l'exemple 4.

10 Exemple 1 : Effet du stress oxydant sur les peroxyrédoxines.

1. Matériel et méthodes

1.1. Séparation en électrophorèse bidimensionnelle

Les protéines cellulaires sont extraites par un mélange contenant 8 M d'urée, 2 M de thiourée, 4 % (p/v) de CHAPS (Cholamidopropyl diméthylammonio propane sulfonate), 40 mM de dithiothreitol et 20 mM de spermine sous forme de base. Après centrifugation à 200 000 g pendant 30 minutes pour éliminer les acides nucléiques, l'extrait est déposé sur une bandelette de gel de polyacrylamide (200x3x0,5 mM) incluant un gradient de pH immobilisé (de pH 4 à pH 8) et contenant 8 M d'urée, 2 M de thiourée, 4 % (p/v) de CHAPS, 10 mM de dithiothreitol et 0,4 % (p/v) d'ampholytes porteurs couvrant l'intervalle de pH 3-10.

Les protéines sont séparées sous l'effet d'un champ électrique (70 000 V.h) et migrent jusqu'à leur point isoélectrique. Après cette séparation, la bandelette de polyacrylamide est imprégnée pendant 30 minutes par un tampon Tris 125 mM, HCl 100 mM contenant 6 M d'urée et 2 % (p/v) de dodécyl sulfate de sodium. La bandelette ainsi imprégnée est placée au sommet d'un gel de polyacrylamide (concentration 10 % p/v) et les protéines sont soumises à une électrophorèse de zone en présence de dodécyl sulfate de sodium. Les protéines sont ensuite révélées sur le gel de polyacrylamide par coloration argentique selon la technique décrite par T. Rabilloud *et al.* (1998) (référence citée).

30 1.2. Mesure du stress oxydant

Des cellules humaines en culture (souche GM10) sont cultivées dans un milieu DMEM (*Dubelcco's modified Eagles medium*).

Deux heures avant la récolte des cellules, du *tert*-butyl hydroperoxyde est ajouté dans le milieu à une concentration finale de 0,15 mM. Après cette période de deux heures, les cellules sont récoltées, lavées avec une solution

saline, puis lysées en présence de cholamidopropyl dimethyl ammonio propane sulfonate à 40 g/l, d'urée 420 g/l, de thiourée 150 g/l et de dithiothréitol 1,5 g/l.

Le lysat cellulaire est ensuite analysé par électrophorèse bidimensionnelle selon la méthode décrite précédemment.

5 La nature des protéines ayant les points isoélectriques et masses moléculaires correspondant à ceux des peroxyrédoxines (formes natives et acides) est confirmée par carte peptidique massique après digestion à la trypsine des protéines séparées sur le gel bidimensionnel.

2. Résultats

10 Ils sont illustrés à la figure 1 et à la figure 2.

Lorsque les cellules ont été soumises à un stress oxydant, on observe une diminution des taches correspondant aux formes natives des différentes peroxyrédoxines (1B figure 1b et figure 2).

15 Bien que la quantité totale de peroxyrédoxines reste globalement identique en l'absence ou en présence d'un stress oxydant, le rapport entre les deux formes est augmenté de manière significative dans les cellules ayant été soumises à un stress oxydant.

Exemple 2 : Effet du stress oxydant sur la peroxyrédoxine de globules rouges.

20 1. Matériel et méthodes

Des globules rouges humains sont suspendus dans 10 fois leur volume de milieu RPMI 1640 (*Rockwell Park Memorial Institute*) et le *tert*-butyl hydroperoxyde est ajouté dans le milieu à une concentration finale de 0,3 mM.

25 Après deux heures d'incubation, les globules rouges sont séparés du milieu réactionnel par centrifugation et rincés dans du tampon PBS salin (*phosphate buffered saline*).

Finalement les protéines sont extraites et séparées comme décrit à l'exemple 1.2.

2. Résultats

30 Ils sont illustrés à la figure 3.

Lorsque les hématies ont été soumises à un stress oxydant, on observe une diminution de la tache correspondant à la forme native de la peroxyrédoxine 1 (1B figures 3A et 3B) et une augmentation de la tache correspondant à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 (1A figures 3A et 3B).

35

Exemple 3 : Détermination du rapport entre les formes acides et natives des peroxyrédoxines au moyen d'un anticorps.

1. Matériel et méthodes

Des protéines de cellules Jurkat en culture sont extraites et séparées
5 comme décrit dans l'exemple 1.

Après séparation, les protéines sont transférées sur membrane de
poly(difluorure de vinylidène). Cette membrane est ensuite mise en contact avec un
anticorps polyclonal réalisé chez le lapin et dirigé contre la peroxyrédoxine 1, puis
après rinçage, avec un conjugué de peroxydase et de protéine A de *Staphylococcus*
10 *aureus*.

La peroxyrédoxine 1 est détectée au moyen de l'activité
enzymatique de la peroxydase.

2. Résultats

Ils sont illustrés à la figure 4.

15 L'utilisation d'un anticorps apte à se lier à la fois à la forme active et
à la forme acide de la peroxyrédoxine 1 permet de quantifier la quantité de chacune
des formes et de déterminer le rapport entre les deux formes.

**Exemple 4 : Détermination du rapport entre les formes acides et natives des
20 peroxyrédoxines après un stress oxydant par l'antimycine A et mesure de l'effet
d'un antioxydant, la phénylbutylnitrone.**

1. Matériel et méthodes

Des cellules Jurkat en culture sont cultivées pendant 24 heures dans
un milieu RPMI 1640 contenant 26 μ M d'antimycine A, 300 μ M de
25 phénylbutylnitrone.

Finalement les protéines sont extraites et séparées comme décrit à
l'exemple 1.2.

2. Résultats

Ils sont illustrés à la figure 5.

30 En présence d'un agent antioxydant, le rapport entre les formes
acides et les formes natives des peroxyrédoxines est diminué.

L'ensemble de ces résultats montrent que la détermination du
rapport entre les formes acides et natives des peroxyrédoxines permet de détecter de
35 manière simple et fiable la présence d'un stress oxydant et donc d'être utilisé comme
marqueur de la présence d'un désordre métabolique lié à un stress oxydant.

REVENDICATIONS

1. Formes acides purifiées des peroxyrédoxines et les fragments de celles-ci, caractérisés en ce qu'ils comprennent, dans une région proche de leurs site
5 actif, la séquence SEQ ID N° 2 suivante :

Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X4 X3 Thr Glu

dans laquelle

X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,

- X2 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la phénylalanine et la
10 proline,

X3 représente un acide aminé choisi dans le groupe constitué par la proline et la thréonine et

X4 représente un acide cystéine sulfinique ou un acide cystéique (acide cystéine sulfonique),

- 15 ainsi que leurs équivalents fonctionnels.

2. Formes acides purifiées selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont issues de mammifères humain ou non.

3. Formes acides purifiées selon les revendications 1 ou 2, caractérisées en ce qu'elles ont choisies dans le groupe constitué par la TDX 1
20 d'origine humaine (SEQ ID N° 3), TDX M d'origine humaine (SEQ ID N° 4), TDX N d'origine humaine (SEQ ID N° 5), AOP 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 6) et TDX 2 d'origine humaine (SEQ ID N° 7), ainsi que leur fragments comprenant la SEQ ID N° 2.

4. Anticorps immunospécifiques caractérisés en ce qu'ils sont dirigés
25 contre les formes acides des peroxyrédoxines selon la revendication 1.

5. Anticorps immunospécifiques, caractérisés en ce qu'ils sont dirigés contre les formes acides des peroxyrédoxines choisies dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7.

- 30 6. Anticorps selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils sont choisis dans le groupe constitué par des anticorps polyclonaux et des anticorps monoclonaux.

7. Réactif pour détecter et/ou doser des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps selon l'une
35 quelconque des revendications 4 à 6.

8. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des

peroxyrédoxines, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec un réactif selon la revendication 7 et une étape dans laquelle on détecte une interaction spécifique entre ledit réactif et les formes acides des peroxyrédoxines présentes dans l'échantillon.

5 9. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on sépare les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique, puis suivant leur poids moléculaire et une étape dans laquelle on détecte et/ou on dose lesdites formes acides présentes
10 dans l'échantillon.

10. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon la revendication 9, caractérisé en ce que la séparation des formes acides et des formes natives des peroxyrédoxines, suivant leur point isoélectrique est réalisée par focalisation isoélectrique.

15 11. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon les revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il comprend en plus la détection des formes natives des peroxyrédoxines et la détermination du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

20 12. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon la revendication 11, caractérisé en ce que la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines sont réalisés avec des anticorps capables de se lier à la fois à la forme native et à la forme acide, après séparation des deux formes.

25 13. Procédé pour détecter et/ou doser les formes acides des peroxyrédoxines, selon la revendication 11, caractérisé en ce que la détection et/ou le dosage des formes acides et natives des peroxyrédoxines sont réalisés avec des anticorps spécifiques de chaque forme.

30 14. Procédé de dépistage d'un trouble métabolique lié au stress oxydant, caractérisé en ce que l'on détermine, *in vitro* dans un échantillon biologique, le rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

35 15. Coffret ou trousse de diagnostic pour mettre en oeuvre le procédé de dépistage selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un anticorps spécifique des formes acides des peroxyrédoxines et au moins un anticorps capable de se lier à la fois aux formes natives et aux formes acides des peroxyrédoxines ou au moins un anticorps spécifique des formes natives des

peroxyrédoxines, des moyens de détection appropriés et au moins un témoin constitué par un échantillon de référence.

16. Méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible de stimuler ladite formation,
- le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

17. Méthode pour sélectionner *in vitro*, des composés aptes à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines, caractérisée en ce qu'elle comprend :

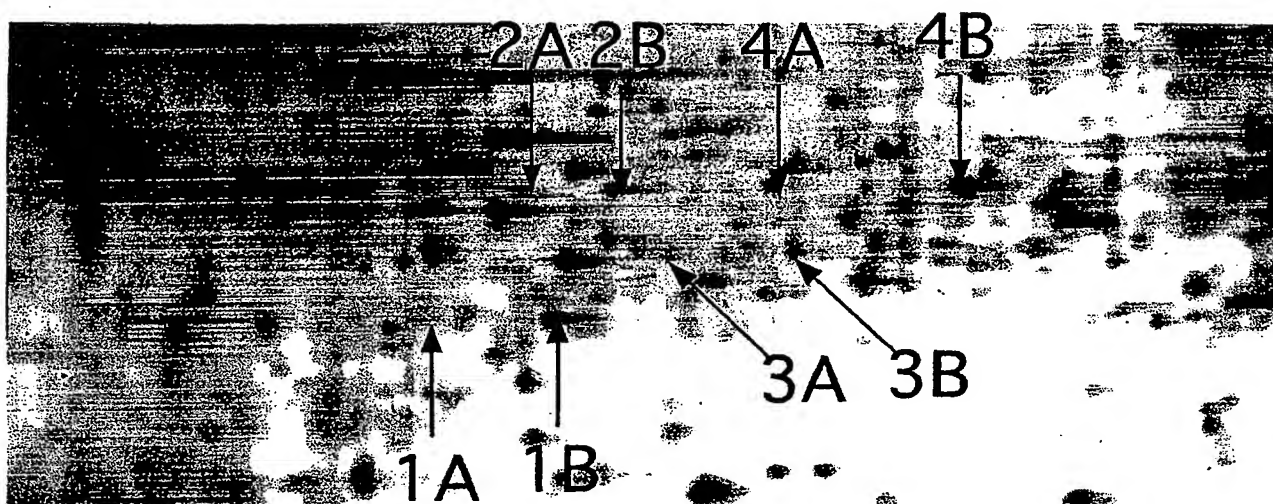
- la mise en contact des formes natives des peroxyrédoxines avec un agent provoquant un stress oxydant, en présence ou en absence d'un composé susceptible d'inhiber ladite formation,
- le dosage des formes acides formées,
- éventuellement le dosage des formes natives des peroxyrédoxines et la mesure du rapport entre les formes acides et les formes natives des peroxyrédoxines.

18. Utilisation d'une molécule apte à stimuler la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la préparation d'un médicament favorisant la mort cellulaire.

19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que le médicament est un anticancéreux ou est utilisable dans le traitement des maladies auto immunes.

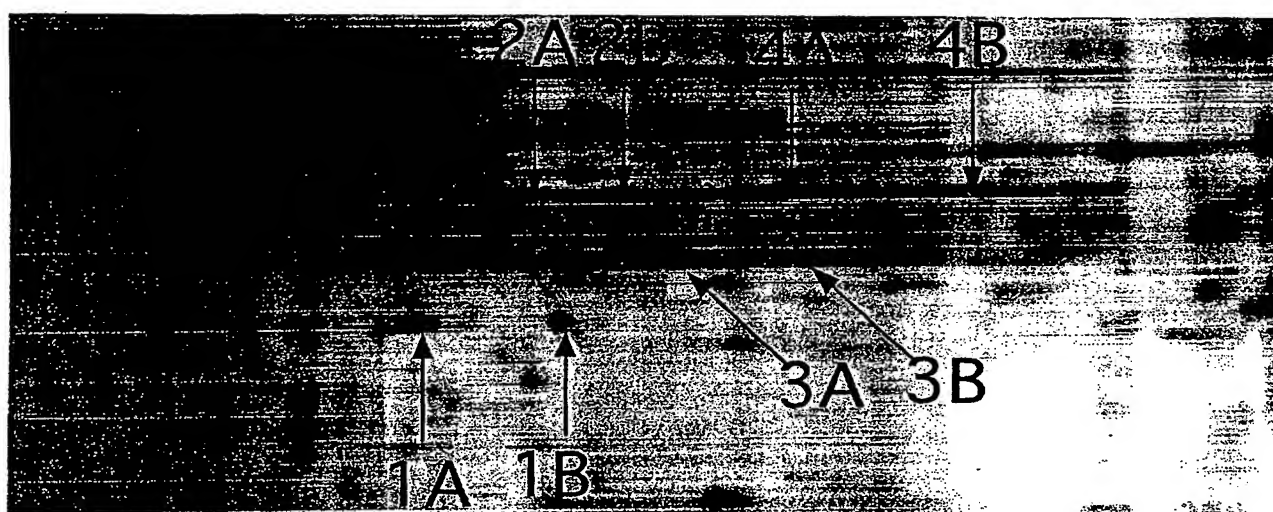
20. Utilisation d'une molécule apte à inhiber la formation des formes acides des peroxyrédoxines pour la préparation d'un médicament inhibant la mort cellulaire.

21. Utilisation selon la revendication 20, caractérisée en ce que le médicament est utile dans le traitement des troubles neurodégénératifs.



extrait cellulaire contrôle

FIGURE 1a

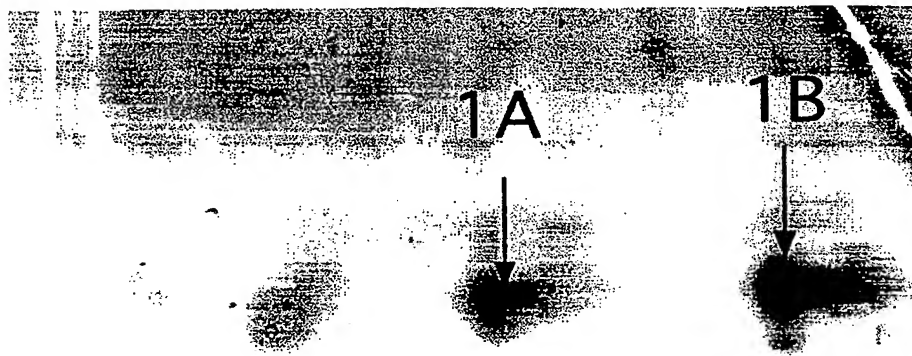


extrait cellulaire traité BHP

FIGURE 1b

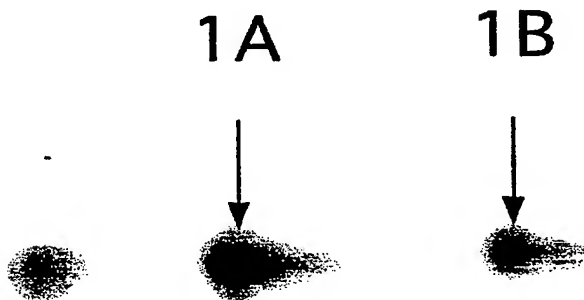
TYPE DE PEROXYREDOXINE	TEMOIN	RAPPORT	STRESS OXYDANT	RAPPORT
TDX1 native	0,341	0,12	0,097	2,5
TDX1 acide	0,043		0,246	
TDXM native	0,066	0,54	0,038	2,18
TDXM acide	0,036		0,083	
TDXN native	0,110	0,35	0,117	0,52
TDXN acide	0,039		0,062	
ULA6 native	0,247	0,26	0,068	1,47
ULA6 acide	0,065		0,100	

FIGURE 2



extrait cellulaire contrôle

FIGURE 3a



extrait cellulaire traité BHP

FIGURE 3b

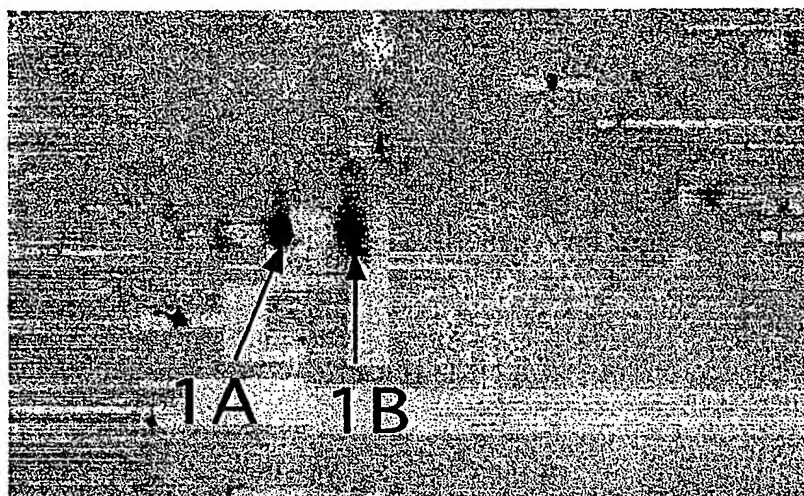


FIGURE 4

TYPE DE PEROXYREDOXINE	JURKAT ANTI A	RAPPORT	JURKAT ANTI A + PBN	RAPPORT
TDX1 native	0,192	0,31	0,360	0,21
TDX1 acide	0,060		0,079	
TDXM native	0,175	0,54	0,132	0,28
TDXM acide	0,094		0,083	
TDXN native	0,067	0,22	0,027	0,14
TDXN acide	0,015		0,004	

FIGURE 5

LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

<120> FORMES ACIDES DES PEROXYREDOXINES ET LEUR UTILISATION
COMME MOYEN DE DIAGNOSTIC

<130> s263FR57

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,
X2 représente Phe ou Pro, X3 représente Pro ou Thr

<400> 1

Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val Cys X3 Thr Glu
1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> X1 représente n'importe quel acide aminé naturel,
X2 représente Phe ou Pro, X3 représente Pro ou Thr
et X4 représente un acide sulfinique ou un acide
cystéique

<400> 2

Pro X1 Asp Phe Thr X2 Val X3 X4 Thr Glu
1 5 10

<210> 3

<211> 198

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Ser Gly Asn Ala Arg Ile Gly Lys Pro Ala Pro Asp Phe Lys
1 5 10 15

Ala Thr Ala Val Val Asp Gly Ala Phe Lys Glu Val Lys Leu Ser Asp
20 25 30

Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr
 35 40 45
 Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asn Arg Ala Glu Asp
 50 55 60
 Phe Arg Lys Leu Gly Cys Glu Val Leu Gly Val Ser Val Asp Ser Gln
 65 70 75 80
 Phe Thr His Leu Ala Trp Ile Asn Thr Pro Arg Lys Glu Gly Gly Leu
 85 90 95
 Gly Pro Leu Asn Ile Pro Leu Leu Ala Asp Val Thr Arg Arg Leu Ser
 100 105 110
 Glu Asp Tyr Gly Val Leu Lys Thr Asp Glu Gly Ile Ala Tyr Arg Gly
 115 120 125
 Leu Phe Ile Ile Asp Gly Lys Gly Val Leu Arg Gln Ile Thr Val Asn
 130 135 140
 Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp Glu Ala Leu Arg Leu Val Gln
 145 150 155 160
 Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Glu His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp
 165 170 175
 Lys Pro Gly Ser Asp Thr Ile Lys Pro Asn Val Asp Asp Ser Lys Glu
 180 185 190
 Tyr Phe Ser Lys His Asn
 195

<210> 4
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ala Ala Ala Val Gly Arg Leu Leu Arg Ala Ser Val Ala Arg His
 1 5 10 15
 Val Ser Ala Ile Pro Trp Gly Ile Ser Ala Thr Ala Ala Leu Arg Pro
 20 25 30
 Ala Ala Cys Gly Arg Thr Ser Leu Thr Asn Leu Leu Cys Ser Gly Ser
 35 40 45
 Ser Gln Ala Lys Leu Phe Ser Thr Ser Ser Ser Cys His Ala Pro Ala
 50 55 60
 Val Thr Gln His Ala Pro Tyr Phe Lys Gly Thr Ala Val Val Asn Gly
 65 70 75 80
 Glu Phe Lys Asp Leu Ser Leu Asp Asp Phe Lys Gly Lys Tyr Leu Val
 85 90 95
 Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile
 100 105 110

Val Ala Phe Ser Asp Lys Ala Asn Glu Phe His Asp Val Asn Cys Glu
 115 120 125
 Val Val Ala Val Ser Val Asp Ser His Phe Ser His Leu Ala Trp Ile
 130 135 140
 Asn Thr Pro Arg Lys Asn Gly Gly Leu Gly His Met Asn Ile Ala Leu
 145 150 155 160
 Leu Ser Asp Leu Thr Lys Gln Ile Ser Arg Asp Tyr Gly Val Leu Leu
 165 170 175
 Glu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn
 180 185 190
 Gly Val Ile Lys His Leu Ser Val Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser
 195 200 205
 Val Glu Glu Thr Leu Arg Leu Val Lys Ala Phe Gln Tyr Val Glu Thr
 210 215 220
 His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn Trp Thr Pro Asp Ser Pro Thr Ile
 225 230 235 240
 Lys Pro Ser Pro Ala Ala Ser Lys Glu Tyr Phe Gln Lys Val Asn Gln
 245 250 255

<210> 5
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Met Glu Ala Leu Pro Leu Leu Ala Ala Thr Thr Pro Asp His Gly Arg
 1 5 10 15
 His Arg Arg Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Phe Leu Leu Pro Ala
 20 25 30
 Gly Ala Val Gln Gly Trp Glu Thr Glu Glu Arg Pro Arg Thr Arg Glu
 35 40 45
 Glu Glu Cys His Phe Tyr Ala Gly Gly Gln Val Tyr Pro Gly Glu Ala
 50 55 60
 Ser Arg Val Ser Val Ala Asp His Ser Leu His Leu Ser Lys Ala Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Lys Pro Ala Pro Tyr Trp Glu Gly Thr Ala Val Ile Asp Gly
 85 90 95
 Glu Phe Lys Glu Leu Lys Leu Thr Asp Tyr Arg Gly Lys Tyr Leu Val
 100 105 110

Phe Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile
 115 120 125
 Ile Ala Phe Gly Asp Arg Leu Glu Glu Phe Arg Ser Ile Asn Thr Glu
 130 135 140
 Val Val Ala Cys Ser Val Asp Ser Gln Phe Thr His Leu Ala Trp Ile
 145 150 155 160
 Asn Thr Pro Arg Arg Gln Gly Gly Leu Gly Pro Ile Arg Ile Pro Leu
 165 170 175
 Leu Ser Asp Leu Thr His Gln Ile Ser Lys Asp Tyr Gly Val Tyr Leu
 180 185 190
 Glu Asp Ser Gly His Thr Leu Arg Gly Leu Phe Ile Ile Asp Asp Lys
 195 200 205
 Gly Ile Leu Arg Gln Ile Thr Leu Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser
 210 215 220
 Val Asp Glu Thr Leu Arg Leu Val Gln Ala Phe Gln Tyr Thr Asp Lys
 225 230 235 240
 His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp Lys Pro Gly Ser Glu Thr Ile
 245 250 255
 Ile Pro Asp Pro Ala Gly Lys Leu Lys Tyr Phe Asp Lys Leu Asn
 260 265 270

<210> 6
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Pro Gly Gly Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala Pro Asn Phe Glu Ala Asn
 1 5 10 15
 Thr Thr Val Gly Arg Ile Arg Phe His Asp Phe Leu Gly Asp Ser Trp
 20 25 30
 Gly Ile Leu Phe Ser His Pro Arg Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr Thr
 35 40 45
 Glu Leu Gly Arg Ala Ala Lys Leu Ala Pro Glu Phe Ala Lys Arg Asn
 50 55 60
 Val Lys Leu Ile Ala Leu Ser Ile Asp Ser Val Glu Asp His Leu Ala
 65 70 75 80
 Trp Ser Lys Asp Ile Asn Ala Tyr Asn Cys Glu Glu Pro Thr Glu Lys
 85 90 95
 Leu Pro Phe Pro Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile Leu
 100 105 110
 Leu Gly Met Leu Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro Val
 115 120 125

Thr Ala Arg Val Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys Leu
 130 135 140
 Ser Ile Leu Tyr Pro Ala Thr Thr Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ile Leu
 145 150 155 160
 Arg Val Val Ile Ser Leu Gln Leu Thr Ala Glu Lys Arg Val Ala Thr
 165 170 175
 Pro Val Asp Trp Lys Asp Gly Asp Ser Val Met Val Leu Pro Thr Ile
 180 185 190
 Pro Glu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys Gly Val Phe Thr Lys
 195 200 205
 Glu Leu Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Gln Pro
 210 215 220

<210> 7
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Met Ser Ser Gly Asn Ala Lys Ile Gly His Pro Ala Pro Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Ala Thr Ala Val Met Pro Asp Gly Gln Phe Lys Asp Ile Ser Leu Ser
 20 25 30
 Asp Tyr Lys Gly Lys Tyr Val Val Phe Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe
 35 40 45
 Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Asp Arg Ala Glu
 50 55 60
 Glu Phe Lys Lys Leu Asn Cys Gln Val Ile Gly Ala Ser Val Asp Ser
 65 70 75 80
 His Phe Cys His Leu Ala Trp Val Asn Thr Pro Lys Lys Gln Gly Gly
 85 90 95
 Leu Gly Pro Met Asn Ile Pro Leu Val Ser Asp Pro Lys Arg Thr Ile
 100 105 110
 Ala Gln Asp Tyr Gly Val Leu Lys Ala Asp Glu Gly Ile Ser Phe Arg
 115 120 125
 Gly Leu Phe Ile Ile Asp Asp Lys Gly Ile Leu Arg Gln Ile Thr Val
 130 135 140
 Asn Asp Leu Pro Val Gly Arg Ser Val Asp Glu Thr Leu Arg Leu Gln
 145 150 155 160
 Ala Phe Gln Phe Thr Asp Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Gly Trp
 165 170 175

Lys	Pro	Gly	Ser	Asp	Thr	Ile	Lys	Pro	Asp	Val	Gln	Lys	Ser	Lys	Glu
			180					185					190		

Tyr	Phe	Ser	Lys	Gln	Lys
		195			

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 581858
FR 9911663

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 97 29766 A (TRIPP CYNTHIA ANN ; HESKA CORP (US); KLIMOWSKI LAURA (US)) 21 août 1997 (1997-08-21) * abrégé * * page 73 * * revendication 20 * ---	1-17
X	WO 93 08827 A (UNIV CALIFORNIA) 13 mai 1993 (1993-05-13) * abrégé * * page 28 * * revendication 4 * ---	1-17
D, X	WO 98 43666 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL ; JACKSON LAB (US)) 8 octobre 1998 (1998-10-08) * le document en entier * ---	1-17
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1999, no. 04, 30 avril 1999 (1999-04-30) & JP 11 004690 A (RES DEV CORP OF JAPAN), 12 janvier 1999 (1999-01-12) * abrégé * ---	1-17
X	WO 96 39424 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); GENTZ) 12 décembre 1996 (1996-12-12) * abrégé * * revendication 1; figure 1 * ---	1-17
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 juin 2000		Panzica, G
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

3

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
E	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200001 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-012791 XP002140148 * abrégé *</p>	1-17
E	<p>& US 5 985 612 A (NI JAN ET AL.) 16 novembre 1999 (1999-11-16) * abrégé; revendication 1; figure 1 *</p>	1-17
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 juin 2000		Panzica, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)